抗輪點病毒與畸葉嵌紋病毒基因轉殖木瓜之育成

包慧俊[1]　龔怡蓉[2]　鄭櫻慧[3]　葉錫東[2]

[1]環球技術學院生物技術系　[2]國立中興大學植物病理學系　[3]農委會農業試驗所植物病理組

摘　要

抗輪點病毒鞘蛋白基因轉殖木瓜於霧峰農試所進行四年的隔離田間試驗後，顯示對木瓜輪點病毒（*Papaya ringspot virus*; PRSV）具有極佳的抗病特性。就在即將結束田間最後一期的觀察時，卻發現轉基因木瓜出現異常的病徵，且蔓延迅速。經病原分離與鑑定後，確認此病徵是由木瓜畸葉嵌紋病毒（Papaya leaf-distortion mosaic virus; PLDMV）所引起。此病毒之前未曾於台灣有詳細的記載，且與輪點病毒屬不同種病毒，因此輪點病毒鞘蛋白轉基因木瓜所有品系對其毫無抗病能力。所幸在中興大學葉錫東教授研究團隊努力研發下，新一代雙抗基因轉殖木瓜於兩年內培育成功。此一雙抗轉基因木瓜仍以病原誘導抗病（pathogen-derived resistance）及基因沉寂（posttranscriptional gene silencing）理論為基礎，利用輪點病毒與畸葉嵌紋病毒之兩鞘蛋白基因複合體為轉殖標的，並配合精湛的木瓜基因轉殖及微體繁殖技術下所建構而成。在經過溫室反覆的挑戰接種病毒後，目前已獲得 38 個同時具有抗輪點病毒與畸葉嵌紋病毒之轉基因木瓜品系。在分子層次的分析上，也證明了如預期的「抗病能力是由基因沉寂所驅動」，且與轉基因的插入套數（copy number）成正相關性。雙抗轉基因木瓜目前已選定三個品系於中興大學北溝農業試驗場進行抗病、遺傳特性及園藝性狀隔離田間試驗評估，也同時於霧峰農業試驗所隔離試驗田進行生物安全評估。不同的基因構築方式、不同的轉殖親本木瓜品種，所組合成的新雙抗基因轉殖木瓜品系，正陸續的由葉錫東教授實驗室培育而出。

關鍵詞：木瓜輪點病毒、木瓜畸葉嵌紋病毒、基因轉殖木瓜

緒言

植物一旦被病毒危害，即無任何化學農藥可供治療，甚至預防。除了育成抗病品種以外，長久來一直找不到一個治本的策略。近年來植物遺傳工程技術之精進，以基因轉殖手法（transgenic approach），將外源基因導入植物染色體中所構築成的轉基因作物，確實表現出其強大的抗病成效，讓防治植物病害，開啟了一個嶄新的里程碑。尤其在防治病毒病害上，更是無往不利，成功的案例極多。本文即介紹台灣所開發的基因轉殖木瓜應用於防治目前兩個木瓜栽培上最大的限制因子－木瓜輪點病毒與木瓜畸葉嵌紋病毒，之成功實例。

木瓜為重要經濟果樹

木瓜（*Carica papaya* L.）是熱帶及亞熱帶低海拔地區廣為栽培的重要果樹。它是多年生半木本的雙子葉植物，生活史比一般熱帶果樹短，種植後 9-10 個月即可採收果實。在土壤養分及環境條件適宜下不會斷果，可終年採收。其熟果富含維他命 A、C 及多種礦物質和有機酸，除鮮食，亦可加工製成蜜餞。其青果為生產木瓜酵素（papain）的主要原料，頗具經濟價值。因為營養價值高，所以木瓜也是一種很好的食療果品，其功效有健脾胃、助消化、通便、降血壓、通乳、驅蟲等。

台灣目前每年平均栽培面積為約為三至四千公頃，主要集中於高雄、屏東、台南、嘉義及南投等地。栽培品種以台農二號為大宗，而以網室栽培方式為主。近年來在政府大力推展下，已打開輸日管道，讓木瓜逐漸成為台灣之重要出口水果。

木瓜輪點病毒

木瓜輪點病毒（*Papaya ringspot virus*; PRSV）屬於馬鈴薯 Y 病毒科（the family *Potyviridae*）之馬鈴薯 Y 病毒屬（the genus *Potyvirus*）。具有長絲狀顆粒，大小約 780×12 nm，可經由機械接種或蚜蟲傳播[14]。Jensen（1949）報告[9]有六種蚜蟲可以非永續性方式（non-persistant type）傳播此病毒。Wang 等

人（1978）報告[16]，在台灣有 *Aphid gossypii*、*A. madieaginis*、*A. nerii*、*Myzus persicae*、*Rhopalosipham madis* 及 *Sinomegousa citricolor* 等六種蚜蟲均可傳播木瓜輪點病毒，其中以桃蚜（*Myzus persicae*）和棉蚜（*Aphid gossypii*）傳播效率最高，可達到 90% 。

木瓜輪點病毒之寄主範圍相當狹窄，僅限於番木瓜科（*Caricaceae*），藜科（*Chenopodiaceae*）及葫蘆科（*Cucurbitaceae*）等雙子葉植物。此病毒在番木瓜科和葫蘆科植物上引起系統性感染，在藜科上則造成局部病斑。

台灣木瓜輪點病害及防治策略

台灣於 1975 年最先在高雄縣的燕巢、阿蓮、大樹等地區發現輪點病毒，之後於短短二、三年內輪點病毒便摧毀全省各地大部份的木瓜栽培園區[16]。木瓜罹病後，新葉黃化萎縮，成熟葉上產生黃綠相間的嵌紋及葉緣乾枯，嚴重者葉片扭曲變形，莖及葉柄出現水浸狀斑點或條斑，其在果實上引起輪環狀之圓斑因而得名輪點病毒。罹病植株生長受阻、結果量大減，果實品質變差並帶有苦味，毫無商品價值。由於本病害無藥劑可供防治，因此田間綜合防治管理，如畦間栽植高莖作物玉米阻隔蚜蟲傳毒、覆蓋有忌避病株性的銀色塑膠布於畦上、栽培時避開秋季蚜蟲高峰期，並配合田間嚴格砍除病株等綜合管理，曾風行一時[17, 19]。但在田間感染源壓力逐年增加下，此種方式最後只能獲得延緩發病，搶收首季果實，於嚴重之疫區幾乎毫無成效。

鳳山園藝試驗所曾不斷的努力於抗病育種研究，育成台農五號耐病性極佳產量亦豐的品種，曾大量推廣一時[1]。可惜因此品種後熟迅速、不耐疫病，且風味不及台農二號，故不為一般消費者所喜，而一直未能成為市場主流。

1984 年中興大學葉錫東教授引進夏威夷輕症病毒系統 PRSV HA5-1，以交互保護（cross protection）原理來防治本省木瓜輪點病害[17,18]。此輕症病毒於夏威夷行之有年且效果良好，因此此方法成為 1984-1993 年間台灣防治輪點病毒的一項重要措施[17, 19]。但因處理幼苗須有熟練技術，及木瓜栽植時間過於集中，此法每年只能提供 200-300 公頃保護的苗木。且又因病毒類緣關係，即所謂系統

專一性保護作用（strain-specific protection），如果不配合田間確效的病株砍除，或在感染病原充斥的環境下，保護效果往往大打折扣[19]。

民國七十七年鳳山試驗分所發展出的網室栽培技術，以抗紫外線尼龍細網覆蓋果園，阻隔蚜蟲傳毒，成效極佳[3]。在各方面技術的提昇下，如利用草蛉捕食紅蜘蛛，網室搭建的企業化，網室設施遂成為木瓜栽培的主流。但由於成本高，颱風季節風險大，病蟲害的管理需要有專門知識，在木瓜產量日增下，農民獲取利潤亦日漸困難。

抗輪點病毒基因轉殖木瓜之育成

1985年Sanford和Johnston提出病原誘導抗病性理論（parasite-derived resistance），即將病原基因體的一部份轉移至寄主染色體內，此寄主便能產生對抗該病原感染的能力[15]。次年Powell Abel等人利用農桿菌基因轉殖技術，首先將菸草嵌紋病毒（*Tobacco mosaic virus*；簡稱TMV）之鞘蛋白基因導入菸草染色體中，所構築出的轉基因菸草確實能表現出對TMV的抗性[13]。此一技術與觀念，開啟了防治植物病毒病害之一新契機。因此葉錫東教授實驗室於民國七十七年即著手基因轉殖木瓜培育之規劃，以分離自台南永康的典型嵌紋病徵輪點病毒PRSV YK之鞘蛋白基因，為轉殖之外源基因。在農桿菌轉殖系統下，配合高效率的木瓜組培技術，總共獲得了30個以上之抗病轉基因木瓜品系[2]。這些品系除了能對抗本地之PRSV系統外，同時亦能對抗來自3個不同地域的PRSV系統；HA（夏威夷系統）、TH（泰國系統）和MX（墨西哥系統）[2,6]。而其抗病機制是由RNA媒介之基因沉寂所誘導（RNA-mediated gene silencing）[11]。

轉基因木瓜田間試驗

在農委會的核准下，轉基因木瓜於1996年春天開始進行田間抗病及園藝性狀評估。試驗田設在台中霧峰農業試驗所當時國內唯一的基因轉殖作物隔離試驗田。從1996至1999年共進行四次的隔離觀察。

經由溫室檢定轉基因木瓜的抗病能力後，挑選了 4 個高度抗 YK 系統的轉基因品系進行田間測試。在第一次試區及第二次試區的觀察中，於 18 個月後，受測的四個轉基因木瓜品系無一出現被病毒感染的嚴重型症狀。而對照組非轉基因木瓜在種植四個月後就已遭全數感染，並表現出典型的嚴重病徵。在試驗期間各品系雖有 20-30%的轉基因木瓜葉片出現輕微的斑駁，然這些受感染植株並不影響其生長與產果量，尤其果實皆無輪點病斑，亦未扭曲變形。在仔細觀察後，多數表現輕微病徵的轉基因植株在夏季生長旺盛時，病徵會消失。顯示轉基因木瓜在田間的抗病能力與植株的生長狀況和環境的條件有關[7]。

1999 年 9 月，轉基因木瓜在第四次田間試驗即將結束評估時卻發現轉基因木瓜有逐漸發病的情形，得病株新葉黃化萎縮（圖一）、莖及葉柄出現水浸狀條斑，果實有塊狀壟起與明顯輪斑，而且病勢蔓延迅速，經 ELISA 檢測發現呈 PRSV 負反應。與此同時，我們從台中縣大里市一帶非網室木瓜栽培園亦分離到一與 PRSV 無血清學關係的病毒分離株。兩者在溫室接種實驗中，皆能對所有的抗輪點病毒轉基因木瓜品系造成嚴重病徵。後經病毒鞘蛋白基因選殖、解序及比對後，證實其為木瓜畸葉嵌紋病毒(*Papaya leaf distortion mosaic virus*, PLDMV)[10]

木瓜畸葉嵌紋病毒

木瓜畸葉嵌紋病毒亦屬馬鈴薯 Y 病毒屬，為長絲狀顆粒，大小約為 750x12 nm，其內包含一個正極性單股核糖核酸。於感染木瓜細胞內會形成風車狀、螺旋狀、薄層狀等內含體。可經由機械接種及蚜蟲以非永續性方式傳播。此病毒最早於 1954 年於日本之琉球島發現，目前以為該島栽培木瓜之最大限制因子。其寄主範圍不如輪點病毒廣泛，僅能感染木瓜及少數葫蘆科瓜類。推測此病毒在台灣之所以一直未被重視，可能是網室栽培盛行或長期被 PRSV 所掩蓋而忽略。目前台灣 PLDMV 系統全長度基因體序列已解讀完成[4]，總共由 10153 個核苷酸所構成，而與日本系統之 PLDMV[12] 比較，其核苷酸序列相似度高達 94%。

雙抗病毒基因轉殖木瓜之育成

Jan 等人（2000）[8] 藉由結合 *Tospovirus* N 基因片段和 *Potyvirus* CP 基因片段，所構築之轉基因植物，能同時抵抗 *Tospovirus* 與 *Potyvirus*。因此利用相同之策略，將 PRSV 與 PLDMV 之 CP 各四分之三長度片段，同時構築於一轉譯架構中（圖二），並在轉譯起始點部位以定點突變方式製造連續兩個轉譯終止碼（TGA），以避免轉基因蛋白質之累積，再藉由農桿菌為媒介將此基因構築轉殖入泰國品種木瓜中。經由組織再生及微體繁殖技術，共獲得 38 個品系之轉殖木瓜。於溫室挑戰接種 PRSV 及 PLDMV 後，證實皆可同時抵抗此兩種病毒之感染，在分子層次上亦證明抗病機制是由基因沉寂作用所驅動 [5]。目前此雙抗病毒型轉基因泰國品種木瓜已於中興大學北溝農業試驗場隔離試驗田完成第一期之田間評估，結果顯示各品系抗病性狀優良（圖三）。而與日陞品種雜交後之子代亦於溫室完成抗病篩選，將於下一期之田間試驗進行優良商業品系之選拔。

結　　語

以基因轉殖策略防治植物病毒病害，目前已在多種病毒上得到驗證。而同時能抵抗兩種以上病毒之基因轉殖植物，雙抗型木瓜就是最好的實例。在傳統抗病育種尚無建樹之時，基因轉殖策略提供一個快速又有效之良法。然田間病毒相複雜難測，可能還存在第三個、第四個病毒。但在深入瞭解轉基因植物的抗病機制後，決定就是在基因的選擇與如何構築了。不同的基因構築方式、不同的轉殖親本木瓜品種，所組合成的新雙抗基因轉殖木瓜品系，正陸續的由葉錫東教授實驗室培育出。

謝　　辭

以基因轉殖技術防治木瓜輪點病毒之研究為過去國科會及農委會補助之研究成果，特此一併致謝。其中包含 1987-1990，三年國科會計畫，木瓜輪點病毒互補核糖核酸之選殖。 1989-1993，四年中美合作計畫(美國農部與農委會)，直接獲取康乃爾大學及夏威夷大學之資訊，將台灣木瓜輪點病毒株鞘蛋白基因構築

於 Ti 載體，發展出農桿菌轉型法，並以組織再生成一轉基因木瓜。1993-2002，九年農委會合作型(興大植病系，植物系，農試所園藝系）計畫，轉基因株系之確認與篩選，溫室及田間之評估，以及目前（2005-2006，國家型計劃辦公室）雙抗轉基因木瓜之構築與田間評估。

引用文獻

1. 王德男 1987 耐毒素病木瓜—台農五號。豐年 37(20): 20-21。
2. 包慧俊 2000 木瓜輪點病毒鞘蛋白轉基因木瓜抗病性狀之研究。國立中興大學植物病理系博士論文。
3. 施明山、陳吉雄、鄧如蘭 1990 木瓜設施栽培。台灣農業 26(5): 101-106。
4. 廖翊廷 2006 台灣木瓜畸葉嵌紋病毒全長度基因體definitions序列之解讀。大葉大學生物產業科技學系碩士論文。
5. 龔怡蓉 2004 木瓜輪點病毒及木瓜畸葉嵌紋病毒雙重抗性轉基因木瓜之育成及木瓜畸葉嵌紋病毒單株抗體之製備。國立中興大學植物病理系碩士論文。
6. Bau, H. J., Chang, Y. H., Yu, T. A., Yang, J. S., and Yeh, S. D. 2003. Broad-spectrum resistance to different geographic strains of *Papaya ringspot virus* in coat protein gene transgenic papaya. Phytopathology 93: 112-120.
7. Bau, Huey-Jiunn, Cheng, Y. H., Yu, T. A., Yang, J. S., Liou, P. C., Hsiao, C. H., Lin C. Y., and Yeh, S. D. 2004. Field evaluations of transgenic papaya lines carrying the coat protein gene of *Papaya ringspot virus* in Taiwan. Plant Disease 88: 594-599.
8. Jan, F. J., Fagoaga, C., Pang, S. Z., and Gonsalves, D. 2000. A single chimeric transgene derived from two distinct viruses confer multi-virus resistance in transgenic plant through homology-dependent gene silencing. J. Gen. Virol. 81:2103-2109.
9. Jensen, D. D. 1949. Papaya ringspot virus and its insect vector relationships. Phytopathology 39: 212-220.

10. Kawano, S., and Yonaha, T. 1992. The occurrence of papaya leaf-distortion mosaic virus in Okinawa. Tech. Bull. of FFTC 132: 13-23. Food and Fertilizer Technology Center for the Asian and Pacific Regions, Taipei, Taiwan, ROC

11. Lomonossoff, G. P. 1995. Pathogen-derived resistance to plant viruses. Ann. Rev. Phytopathol. 33: 323-343.

12. Maoka, T. and Hataya, T. 2005. The complete nucleotide sequence and biotype variability of Papaya leaf-distortion mosaic virus. Phytopathology 95:128-135.

13. Powell Abel, P., Nelson, R. S., De, B., Hoffman, N., Rogers, S. G., Fraley, R. T., and Beachy R. N. 1986. Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene. Science 232: 738-743.

14. Purcifull, D. E., Edwardson, J. R., Hiebert, E., and Gonsalves, D. 1984. Papaya ringspot virus. CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses, No.84.

15. Sanford, J. C. and Johnston, S. A. 1985. The concept of parasite-derived resistance : deriving resistance genes from the parasite' s own genome. J. Thero. Biol. 113: 395-405.

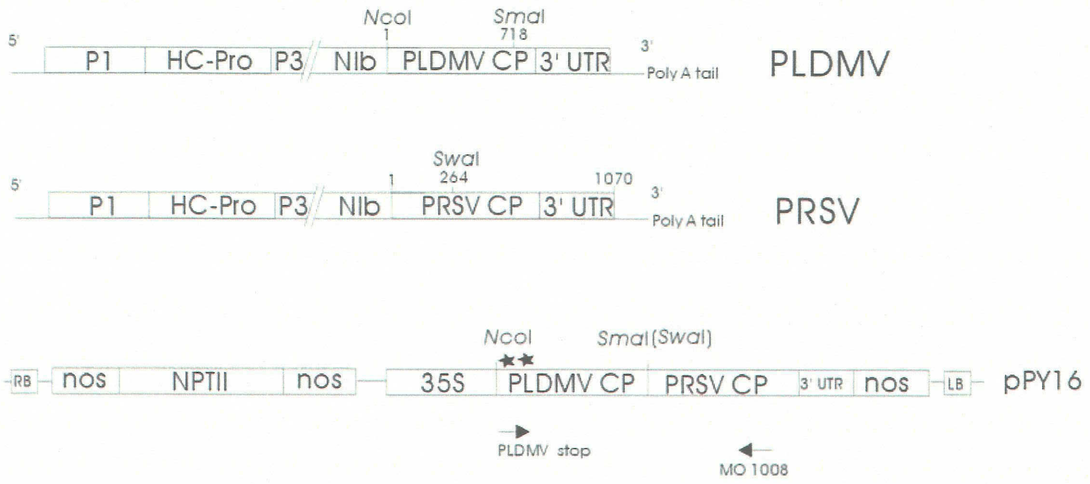
16. Wang, H. L., Wang, C. C., Chiu, R. J., and Sun, M. H. 1978. Preliminary study on papaya ringspot virus in Taiwan. Plant Prot. Bull. 20: 133-140.

17. Wang, H. L., Yeh, S. D., Chiu, R. J., and Gonsalves, D. 1987. Effectiveness of cross-protection by mild mutants of papaya ringspot virus for control of ringspot disease of papaya in Taiwan. Plant Dis. 71: 491-497.

18. Yeh, S. D., Gonsalves, D., Wang, H. L., Namba, R., and Chiu, R. J. 1988. Control of papaya ringspot virus by cross protection. Plant Dis. 72: 375-380.

19. Yeh, S. D., and Gonsalves, D. 1994. Practices and perspective of control of papaya ringspot virus by cross protection. Adv. Dis. Vector Res. 10: 237-257.

圖一、抗輪點病毒基因轉殖木瓜於田間被木瓜畸葉嵌紋病毒感染之情形。新葉黃化萎縮。



圖二、雙病毒鞘蛋白基因雜合體轉基因之構築。PLDMV stop 及 MO1008 為專一性引子對，可批出一約 1.3 kb 大小之 DNA 片段，用以偵測轉基因之存在。★表轉譯終止碼（TGA）。

圖三、雙抗型轉基因木瓜於田間栽培八個月後之情形。
左為轉基因木瓜；右為對照組非轉殖木瓜。